(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(II)特許出康公開發号 特開2001-91517

(P2001-91517A)

(43)公園日 平成13年4月6日(2001.4.6)

(51) Int.CL?	級別記号	FI	ラーヤユージ(参考)	
G01N 33/92		GOIN 33/92	Z 2G048	
CO7K 14/47		CO7K 14/47	4B024	
14/745		14/745	4B064	
18/36		16/36	4H045	
C12N 15/09		GO1N 33/53	D	
	審查韵求	未商求 請求項の数8 〇	L (全 15 頁) 最終頁に続く	
(2!)出顯番号	物廠2000-12210(P2000-12210)	(71)出顧人 000141875 株式会社が	and the second s	
(22)出版日	平成12年1月20日(2000.1.20)		8市伏見区羽束阿古川町328番地	
(31)優先機主張普号 (32)優先日	特個平11-207913 平成11年7月22日(1999.7.22)	京福南京都	。 3市伏見区羽東第古川町328番地 いかがく内	
(33)優先權主張国	日本 (J P)	(72)発明者 真葉 新一 京都南京都市伏見区項東第古川町328番地 株式会社いかがく内		
		(74)代理人 100095318 弁理士 名	(為三雄 (外2名)、	
	•		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血液中の低比難リポ蛋白 (LDL) もしくは変性低比重リポ蛋白の検出方法

(57)【要約】

【課題】動無硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と 深く関わる、しひしおよび変性しひし(特に酸化しひ し)の新規な後出方法を提供する。 【解決手段】変性低比重リポ蛋白(特に酸化しひし) と、急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、もし くはマクロファージが産生する穀官物質との複合体を測 定対象にする。

【特許請求の範囲】

【請求項!】低比重リポ蛋白(LDL)、またはしDL が酸化変性されてなる変性低比量リボ蛋白(変性しD L:酸化LDしを含む)と、

急性相反応物質、血液凝固・根溶系関連蛋白、もしくは マクロファージが産生する殺菌物質との復合体を測定対 象にする血液中のLDLおよび変性LDLの検出方法。

【請求項2】 α1ーアンチトリプシン、フイブリノーゲ ン、フイブロネクチン、リボ登白(a)、C-reactive or otenn (CRP), Serum amyloid A(SAA), Serum amyloid 10 P component (SAP) . α2ーマクログロブリン、α1 アンチキモトリプシン、α! - アンドグリコプロティ ン、簡体成分などの急性組反応物質と、

LDしもしくは変性LDしとの複合体を測定対象とする 請求項1に記載のLDLもしくは変性しDLの輸出方 法.

【請求項3】組織因子、プラスミノーゲン、プロトロン ピン、トロンピン、アンチトロンピン3、プラスミンア クチベーターインヒビター」などの疑問・線忽系関連環 白としDLもしくは変性しDLとの複合体を測定対象と 20 する論求項1に記載のしひしもしくは変性しひしの検出

【闘求項4】ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリ ン、リゾチーム、塩基性蛋白などのマクロファージが産 生する殺菌物質とLDLもしくは変性LDLとの複合体 を測定対象とする請求項1に記載のLDLもしくは変性 LDLの検出方法。

【請求項5】酵素免疫法、ラッテクス凝集法、免疫発光 分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い る請求項1~4に記載のLDLもしくは変性LDLの検 39 出方法。

【詰求項6】抗ヒトフィブリノーゲン抗体と、酵素をは、 じめとする標識物質を標識した抗ヒトAnoB抗体など の免疫反応検出試薬を用いる請求項2 に配戴の動脈硬化 性病変に関わる新規なリボ蛋白の検出方法。

【語求項7】抗ヒトフィブロネクチン抗体と、酵素をは しめとする標識物質を標識した抗ヒトApoB抗体など の免疫反応検出試業を用いる請求項2に記載の動脈硬化 性病変に関わる新類なリボ蛋白の検出方法。

【諺水項8】マウス骨髄騒細胞と、LDL/フィブロネー クテン複合体で免疫された哺乳類の脾臓細胞とを融合さ せて得られるハイブリドーマにより産生されるモノクロ ーナル抗体であって、nativeなフィブロネクチンやAp oB (nativeloよび変性ApoB) には反応せず、LD レノフィブロネクチン複合体を特異的に認識するモノク ローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】この発明は、血液中に存在する変

性相反応の過程で産生される(急性相反応登白の一部は マクロファーンも産生する) ところの各種急性組反応物 貫(acute phase reactants)や、各種の超回・線絃采開 連盟白、もしくはマクロフアージが産生する各種の殺菌 物質と複合体を形成して存在することを見出すととも に、この点に着目した新規な変性LDL(特に酸化変性 LDL)の検出方法に関するもので、助脈硬化性病変や アルツハイマー病などの早期診断や治療上での薬効評価 などに寄与せんとするものである。

2

[0002]

(2)

【発明が解決しようとする課題】動脈硬化症は大助脈、 冠状動脈、脳動脈および頚動脈に多く発生し、心筋梗 **2. 脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近で** はアルツハイマー病も動脈硬化症と関連性の大きい疾患 であることがわかってきた。従来、血液中で、これらの 生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する制定対象が なく、血清中あるいは血験中のLDL、LP(a)、レ ムナントリボ翼白、Small、denseLDしなど、しDしを 主体とした血管監脳質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性 病変に関わるリボ蛋白として測定されてきた。なかんず く、酸化しDLと露状動脈硬化病変の進展との関連がス タインバーグ(Steinberg, O. et al. Engl. Ned. 320: 915, 1989)により、一方、Rossらが提唱した傷害反 応仮説(Ross, R. Nature, 362:801, 1993)によって指 摘されて以来、動脈硬化の進度における酸化しDLの関 与が注目されてきた。

【0003】さらに、最近では、動脈硬化を炎症として 捉える立場の研究が盛んである(Ross, R. Now Engl. J. Med. 340: 115~126, 1999)。急性相反応と動脈硬化 の関連性に関して(西順一郎、他、助緊硬化、24:363 ~367, 1996) によれば、生体は感染や外傷などの外か ちの刺激に対して、発熱、血管透過性亢進による浮胆、 血小板凝集と凝固亢進による止血、免疫担当細胞の活性 化を通じて、すみやかに病原体の排除や組織障害の回復 を図り恒常性を維持する。との生体反応を急性相反応(A cute phase response)と呼んでいる。 窓築や外傷などの 外的刺激に対するこの生体反応は、人類の進化とともに 発達してきた重要な防御機構である。一方、今世紀に入 って、われわれ人類の生活環境の急激な変化は、この外 的刺激を減少させる一方で、高脂血症・高血糖などの内 部環境の変化を通じて、酸化変性LDLやAdvanced gly cation endoproduct (AGE) などの生体内移験物質を も増加させる結果を生んできた。マクロファージ系細胞 や血管内皮細胞には、これらの生体内修飾物質を認識す る特異的レセプターが発現しており、生体はこれらの細 胞を通じて生体内修飾物質を処理する機構を有してい る。とのことは酸化LDLやAGEが体内では異物とし て作用していることを示しており、この「異物処理過 程。で、はからずもマクロファージ・内皮細胞の活性化 性しDL(特に酸化変性しDL)が、生体内における急 50 がひきおこされる。即ちこの一連の過程は動脈硬化の成

特開2001-91517

立プロセスとみなすことが出来る。

*な主な物質器からなっている(Steel DM, et al. Immuol

【0004】そして、上述の生体反応、即ち急性組反応 Today, 15:81~88, 1994)。

【0005】 【数1】

の過程で、血験中に有意に増加してくる物質を急性相反 応物質あるいは急性相反応薬白と呼び、表1に示すよう*

多1 代表的な急性相反応蛋白の種類*

Major APRe	Complement proteins	Consulation proteins	
C-reactive protein	C2,C3,C4.C6.C9	Fibrinogen	
Serum amorbold A	Pactor B	von willebrand factor	
Serum amyloid P component	C1 inhibitor	•	
	C4 binding protein		
Proteinese Inhibitors	Metal-hinding proteins	other proteins	
ar andirypsin	fiautoglobin	a r-edd glycoprotein	
on-antichymotrypsie	Hereoperin	Heme oxygenese	
as-seminardn	Cerukokssum	cristone gratherid-seemestd	
Heparin cofactar II	Manganese supercuide dismutate	Lipoprotein (a)	
Pleaminogen activator		LPS hinding protein	
inhibitor 1		Floromento	
a s-macroalobrin		•	

#Steel MDらのデータを一部改変(Steel DM. et al. Immunol Today, 16: 81, 1994)

【0006】一方、ヒト大助脈粉状硬化病変敵に急性相反応物質が局在することが免疫組織化学築色法やin sit u hybridization法で確認されている。 CRP、SAA、SAPに関しては(個中黨、他、勢脈硬化、24:551~555、1997)、fibrinogenalよびその分層産物に関して(Bim. A et al. Arteriosclerosis, 9:109~121, 1989)、α1-アンチトリブシンに関して(竹屋元給、未発表、1999)が知られている。

【0007】現状では動脈硬化における各種急性相反応 30 物質の役割分担については不明な点が多く、今後の研究 の進展が期待されている。また、動展硬化病変には組織 因子(TF)の過剰発現とともに、血管内で生じたフィ ブリン血栓の溶解に関与する組織プラスミノーゲンアク チベーター(t-PA)の阻害因子であるプラスミノー ゲンアクチベーターインヒビター(PA!)活性やトロ ンピン受容体も同時に亢進しており、これらの因子も動 **脈硬化内膜の凝固亢進に関与しているととが知られてい** る(小川久雄、最新医学、54:1216~1217, 1999)。さ らに、動脈硬化の発生造展に関連して動脈壁でおとる程 4G ャの病的現象は、フィブリンを中心として経菌領溶系の 諮因子が複雑に関連して進展する、即ち、動脈硬化病変 部位は血栓形成の"場"となりやすいことも知られてい る (田中健康 日本老年医学会雑誌 35:880~890,19 98)。また、上述のごとくアテローム性動脈硬化におい ては血液中のLDLが血管壁に沈君すると、内皮細胞が 活性化され、血中の単球がもぐり込んできてマクロファ ージとなり血管壁に花着したLDLを異物として処理す る以外にも、最近の報告によると、動脈硬化の発症・進 **恩にクラミジアニューモニエやヘリコバクタービロリ菌 50**

の感染が関与することも知られ(Mirat V. et al. JID. 177: 725~729、1998)、(Patel P. et al. JML. 31 1: 711~714、1995)、また、動脈硬化病変部位において、これらの病原菌の存在が確認されている。従って、動脈硬化病変部位に浸潤したマクロフアージは、血管壁に洗着したLDLの処理以外に、これら病原菌の排除のためにも種々の殺菌物質を血管壁で放出する状況にあるといえる。

【0008】一方、この様に、動脈硬化発症、進展に関わる要因の解明が進む反面。変性LDL(酸化変性LDL)の側定法に関しては、血中で簡易に正確性をもって側定する方法が存在しなかった。したがって本研究は、動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・道層と深く関わる。しDLもよび変性LDL(特に酸化LDL)の新規な検出方法を提供することを課題とする。

[0009]

【課題を解決するための手段】生体の主要な構成成分として蛋白質、脂質、糖質、核酸があげられるが、最も酸化されやすいのは脂質であり、酸素添加反応が起こり、いわゆる過酸化脂質が生成する。脂質が酸化されやすいのは多くの脂質がリノール酸やアラキドン酸のような高度不穀和脂肪酸のエステルとなっているためである。リボ蛋白は脂質と蛋白質から構成されており、リボ蛋白が酸化された場合には、脂質、蛋白質共に酸化変性を受ける。

【0010】との生体脂質が非酵素的に酸化される引き 金としては、活性酸素が考えられている。この過酸化脂 質の測定は順相HPLC法などの分析化学的手法が用い られ、健富人の生体内でも確実に脂質の非酵素的酸化が 起きていることが証明されている(山本順寛, 他. 圏白 質・核殿・酵素、44:1253、1999)。

【0011】上述のごとく現状では、血液中の総趣酸化 脱質量の把趣は可能であるが、リボ蛋白個別の酸化変性 度を知る方法は現在のところ存在せず、LDLの酸化変 性体が血液中に存在することの実証は、本発明者らの特 類平8-317162号による方法によって初めて成さ れた。さらに本発明者は、特額平11-109001 号、特額平11-207913号に開示した手法によっ ても血液中の酸化変性LDLの検出が可能であることを 10 み目した

【0012】そして、その後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中に酸化変性しDLが穏々の急性相反応納質や、血液超固・微溶関連蛋白もしくは、マクロファージが確生する各種製菌物質(滝 露雄、他、医学のあゆみ、156:194~197、1991)と複合体を形成して存在する亭実を発見して本発明に至った。即ち、特類平8-317162号、および、特曜平11-207913号の手法を発展させて、血液中のLDLおよび変性LDL(特に酸化変性LDL)の検出方法を確立して本 20 免明を完成させたものである。

【0013】より具体的に説明すると、本発明は、たと えば、血管内壁下でしDLが酸化変性を受けるとその局 所に血管腔から滲み込んだないしは、マクロファージが 産生したところの表とに示すような代表的な急性相反応 蛋白(@1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン、フ イプロネクチン、CRP、SAA、SPA、α1-アン チキモトリプシン、α1-アシドグリコプロティン、α 2-マクログロブリン)と変性LDL (特に酸化変性し DL)が複合体を形成すること、さらに、動脈硬化内膜 30 での凝固亢進に関与する(組織因子、プラスミノーゲ ン。プロトロンピン、トロンピン、アンチトロンピン。 3. プラスミンアクチベーターインヒビター1など) 澄 白とも変性しひし〈特に酸化変性しひし〉が複合体を形 成することもよび、動脈硬化病変部位に浸潤してきたマ クロフアージが、異物処理過程で放出するミエロベルオ キシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチーム、短番性蛋白 などの殺菌物質ともしDLおよび変性LDL(特に酸化 変性しDL〉が複合体を形成することを見出した。 これ ちのいずれの複合体も動機硬化症の発症・造閥と関連性 40 が高い点を見出して完成されたものである。

【0014】なお典型的には、本発明は、酸化変性LDLとα1-アンテトリプシンの復合体を特異的に認識する抗体(特顯平8-317162号)を作製したと同様に、しDLおよび酸化変性LDLと複合体を形成している各種抗原に対する特異抗体を作製。または、抗ヒトフィブリノーゲン抗体(DAKO)を閏相抗体として用い、しDLおよび酸化変性しDLと各種蛋白との複合体を反応させた後に、酵素をはじめとする標識物をラベルした抗ヒトApoB抗体を反応させて、血液中の酸化変

镗しDLを検出する方法である。

【0015】との場合、用いる試料は血液中のLDLを 超速心法や、デキストラン硫酸とカルシウムイオンなど の化学物質を用いた沈凝法で分極したしDLもしくは、 血清や血酸をそのまま試料として測定することも可能で ある。また、これらの各種選白と複合体を形成したLD Lおよび酸化変性LDLの検出法の臨床応用としては、 動脈硬化症やアルツハイマー病の早期診断や、動脈硬化 症治療業便与時の薬効評価などに好適である。

0 [0016]

【発明の実施の形態】以下、本発明について具体的に説明する。

A. 急性相反応物質と複合体を形成したLDLもしくは 酸化変性LDLの検出例

(A-1) [超速心または硫酸デキストラン/Ca沈澱 法により調整したLDL中のLDLもしくは変性しDL (酸化変性LDL)/CRP複合体の測定]

[0017] 1. 抗ヒトCRPボリクローケル統体(DAKO社)を0.05M Tris-HCl(0.15M NaClを含む、pH8.0) 緩筒液に10μg/mJの割合で加え、マイクロブレートに100μJ/mellで分達する。

- 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン木で3回洗浄し、0. 1%ショ輪および牛血清アルブミン、0. 05%アジ化ナトリウムを含む0. 05M Trns-HC1戦俗液(pH7. 5)を10μ1/wellで分径し、窒温で30分以上辞職した後、液を楽て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロブレートを脱イオン水250μ1/wellで3回洗浄する。
- 3. マイクロプレートに5.5 mg/ml Nouse Canna Globul inとGoat Gama Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100μl/well分注し、これに試料あるいは標準液を50μl添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5. 0. 0.05%Tween20溶液250μ1/we11で5回流 浄する。
- 6. ビオチン課題Fab´ 化IqC-apo8/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1. 8 μq/mlとしたものを100μ1/me11分注する。
- 7.37℃で1.5時間反応させる。
- 46 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250μ1/w ellで5回洗浄する。

【0018】9、HRP機識アビジンD (Vector labor atories社報)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μl/well分注する。

- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tween20溶液250μ1/wellで5回 洗浄する。
- 12. 過酸化水素溶液とTMB 2 溶液からなる呈色試薬を100 μ l/well分離し、室温下30分間反応させる。
- した抗ヒトApoB抗体を反応させて、血液中の酸化度 50 13.1Mリン酸水溶液を100μ1/mel1分注し、反応

を停止させる。

14. 主波長450 mm、副波長830 mmで測光する。

7

15. 人工的に調整した変性しDL(酸化しDL)/C RP複合体により求めた検査線から試制中の変性しDL (酸化LDL)/CRP複合体濃度を算出する。

【0019】(A-2)〔超遠心または硫酸デキストラ ンノCa社業法により調整したLDL中のLDLもしく は変性しDL (酸化変性しDL) /アミロイドA複合体 の創定し

体(DAKO社)をも、0.5M Tris-HCI(0、1.5M Na 口を含む、pH8. () 経資液に 1 () μ q/m1の割合で加

え、マイクロブレートに100 #1/mellで分注する。

- 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオ ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む0、05M Tr 1s-HCT縦筒液 (pH7. 5) を10 #1/wellで分注し、室 湿で30分以上篩蹬した後、液を楽で4℃で乾燥させ る。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250μ1/
- 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Canna Globul inとGoat Gamma Globlin含有1%ウシアルブミン溶液を 100 m 1/we11分注し、これに試料あるいは標準液を5 0 μ 1 添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。

wellで3回洗浄する。

- 5. 0. 005%Tween20窓液250 μ1,Are11で5回洗 冷する。
- 8. ビオチン縹識Fab′(kIqG-apo8/427モノクローナ ル抗体を1%BSA溶液で1. B ng/mlとしたものを1 0 0 μ 1/well分注する。
- 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250μ1/w el1で5回洗浄する。

【0021】9. HRP領識アビジンD(Vector labor atories社談) を1%カゼイン溶液で15000倍帯駅 とし、100 m 1/we11分注する。

- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tvreen20溶液250μ1/we11で5回 洗浄する。
- 12. 過酸化水素溶液とTMB2溶液からなる量色試業 40 を100 m 1/me11分注し、室温下30分間反応させる。
- 13.1Mリン酸水溶液を100 u 1/ve11分性し、反応 を停止させる。
- 14. 主波長450 nm、副波長630 nmで測光する。
- 15. 人工的に調整した変性しDL(酸化しDL)/ア ミロイドム複合体により求めた検査線から試料中の変性 LDL (酸化LDL) /アミロイドA複合体濃度を算出

【0022】(A-3) 【超途心または硫酸デキストラ ン/Ca洗漱法により調整したLDし中のLDしもしく 50 mlの割合で加え、マイクロプレートに 1 0 0 u l Avellで

は変性LDL(酸化変性LDL)/α2-マクログロブ リン複合体の測定]

【0023】1、抗ヒトα2ーマクログロブリンポリク ローナル抗体 (DAKO社) を0.05M Tms-HC1 (i). 15M NaClを含む、pH8. (i) 緩衝液に1() u q/ mlの割合で加え、マイクロブレートに100μ1/vellで

分注する。 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオ ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ 【0020】1. 抗ヒトアミロイドAポリクローナル抗 10 ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む0、05m Tr 1s-HCI報償液 (pH7.5)を10 #1/Me11で分注し、窒 温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させ

る。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250 μ1/ wellで3回洗浄する。

- 3. マイクロブレートにららma/miMouse Gamma Globulti nとGoat Gama Globulin含有1%ウンアルブミン溶液を 100ml/well分注し、これに試料あるいは標準液を5 () μ 1 添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 20 5.0.005%Tween20溶液250μ1/we11で5回流 待する。
 - 6. ビオチン標識Fab′ 化IqG-apo8/47モノクローナ ル抗体を1%BSA溶液で1. 6 # g/mlとしたものを1 (1) μ1/well分泌する。
 - 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
 - 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250 u 1/w el1で5回洗浄する。

【0024】9、HRP標識アビジンD(Vector Tabor atories社製) を 1%カゼイン溶液で 15000倍希釈

- とし、100 # 1 Ave 11分注する。
 - 10.37℃下で30分間反応させる。
 - 11、0、005%Tween20溶液250±1/we11で5回 洗浄する。
 - 12. 過酸化水素溶液とTMB 2溶液からなる量色試菓 を100ml/xel1分注し、室温下30分間反応させる。 13.1Mリン酸水溶液を100 m1/mel1分注し、反応 を停止させる。
 - 14. 主液長450 nm、副液長630 nmで割光する。
 - 15. 人工的に調整した変性しDL (酸化LDL) / α 2-マクログロブリン複合体により求めた検査線から試 料中の変性LDL(酸化LDL)/a2-マクログロブ リン複合体濃度を算出する。

【0025】(A-4)【超遠心または硫酸デキストラ ン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしく は変性LDL (酸化変性LDL) / α1-アンチキモト リプシン彼合体の測定】

【0028】1、抗ヒトα1ーアンチキモトリプシンポ リクローナル抗体(DAKO社)を①、①5N Tris-HCl (1). 15M NaClを含む、pH8. (1) 級債液に1() u q/

分在する。

- 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0. 1%ショ糖および牛血清アルブミン、0. 05%アジ化ナトリウムを含む0. 05M Trns-HCT軽偽液 (pH7. 5)を10μ1/wellで分注し、窒湿で30分以上詳疑した後、液を築て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロブレートを脱イオン水250μ1/wellで3回洗浄する。
- 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Gamma Globul inとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100μ1/m217分注し、これに試制あるいは標準液を50μ1添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5. 0. 0 0 5 % Tweenzθ密液 2 5 θ μ 1, we 11で 5 回洗 巻する。
- 6. ビオチン標識Fab' 化IqG-apo8/427モノクローナル病体を1%BSA溶液で1. 6 u q/mlとしたものを1 0.0 μ 1/we11分注する。
- 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 8.3、と同様に0.005%TweenZo溶液250 // 1/w 29 e11で5回洗浄する。
- [0027] 9. HRP機識アビジンD (Vector labor atories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μl/well分注する。
- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tween20溶液250μ1/wel1で5回 洗練する。
- 12. 過酸化水素溶液とTMB 2溶液からなる量色試薬を100 μ1/νe11分注し、室温下30分間反応させる。
- 13.1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応 30を停止させる。
- 14. 主波長450 nm、副波長630 nmで測光する。
- 15. 人工的に調整した変性LDL(酸化LDL)/α 1-アンチキモトリプシン複合体により求めた鈴蓋線から試料中の変性しDL(酸化LDL)/α1-アンチキモトリプシン複合体速度を算出する。
- 【0028】(A-5) 【超遠心または硫酸デキストラン/Ca 沈毅法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) / α1-アシドグリコプロティン復合体の測定】
- 【0029】1、抗ヒトα1ーアシドグリコプロテインボリクローナル統体(DAKO社)を0.05M Tris-HCI(0.15M NaClを含む、pH8.0) 緩倫液に10μ q/mlの割合で加え、マイクロプレートに100μ1/wellで分注する。
- 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に関イオン水で3回洗浄し、0. 1%ショ糖および牛血清アルブミン. 0. 05%アジ化ナトリウムを含む0. 05M Tr 15HCT軽資液 (pH7. 5)を10μ1/mel1で分注し、空温で30分以上辞聞した後、液を空て4℃で乾燥させ

- る、乾燥したマイクロブレートを脱イオン水 250μ 1/wellで3回税争する。
- 3. マイクロブレートに5 5 mg/ml Mouse Gamma Clobul inとGoat Gamma Clobulin含有1%ウシアルブミン溶液を100 ml/mell分注し、これに試料あるいは標準液を50 ml i添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。

- 5. 0. 0 0 5 % Tween 20 溶液 2 5 0 μ 1 Ave 11で 5 回流 待する。
- 6. ビオチン標識Fab′(ŁIqG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1. 6μq/mlとしたものを1 00μ1/me11分注する。
 - 7.37℃で1.5時間反応させる。
 - 8.3、と同様に①.005%Tween20落液250μ1/mel1で5同洗浄する。
 - 【0030】9、HRP標識アビジンD (Vector labor atories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍帯駅とし、100μl/well分注する。
 - 10.37℃下で30分間反応させる。
- 20 11.0.005%TweenZ0密蔵250μ]/wellで5回 洗浄する。
 - 12. 過酸化水素溶液とTMB2溶液からなる量色試薬を100 μ1/well分注し、室温下30分間反応させる。 13. 1 Mリン酸水溶液を100 μ1/well分注し、反応を停止させる。
 - 14. 主波長450 nm、副波長630 nmで測光する。
 - 16. 人工的に調整した変性LDL(酸化LDL)/α 1-アシドグリコプロテイン複合体により求めた検査線 から試料中の変性LDL(酸化LDL)/α1-アシド グリコプロテイン複合体遺度を算出する。
 - 【0031】B. 血液凝固・線溶系関連蛋白と複合体を 形成したLDしもしくは酸化変性LDLの検出例
 - (<u>B-1</u>) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca注波 法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL)/トロンビン複合体の測定]
 - 【0032】1. 抗ヒトトロンビンポリクローナル抗体 (DAKO性)を0.05M Tris-HC1(0.15M NaCl を含む、pH8.0) 経筒液化10μq/mlの割合で加え、 マイクロプレートに100μ1/wellで分注する。
 - 2.4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖はよび牛血消アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Trns-IC環筒液(pH7.5)を10μ1/mellで分達し、窒温で30分以上静置した後、液を架て4℃で乾燥させる。乾焼したマイクロブレートを脱イオン水250μ1/mellで3回洗浄する。
 - 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Garma Globul inとGoat Garma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100 μl/mell分注し、これに試料あるいは標準液を5.0 μl/添加する。

- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5. 0. 005%Tyreen20溶液250μ1/we11で5回流 巻する。
- 6. ビオチン領職Fab (LIQG-apoB/427モノクローナ ル抗体を1%BSA溶液で1.6 u q/mlとしたものを1 (0) μ1/well分法する。
- 7、37℃で1.5時間反応させる。
- 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250 μ1Ar el1で5面洗浄する。
- 【0033】9、HRP領識アビジンD(Vector labor 10 atories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍帯釈 とし、100 m 1/me11分注する。
- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tween20溶液250μ1/we11で5回 洗浄する。
- 12 過酸化水素溶液とTMB2溶液からなる量色試薬 を100 m1/well分注し、室温下30分間反応させる。
- 13.1Mリン酸水溶液を100 u 1/we11分注し、反応 を停止させる。
- 14. 主波長450 nm、副殺長630 nmで測光する。
- 1.5、入工的に調整した変性LDL(酸化LDL)/ト ロンビン複合体により求めた検査線から試料中の変性し DiL(酸化LDL)/トロンピン複合体濃度を算出す
- 【0034】(B-2) [超遠心または硫酸デキストラ ン/Ca社験法により調整したLDL中のLDしもしく は変性LDL (酸化変性LDL) /アンチトロンピン3 復合体の測定]
- 【0035】1、杭ヒトアンチトロンピン3ポリクロー ナル技体 (DAKO社) を 0. () 5 MTms-HCI ((). 1 30 5 M NaClを含む、pH8、()) 経筒液に 1 () μ q/m1の割合 で加え、マイクロプレートに100μ1/wellで分注す。
- 2. 4℃下で一夜、物環販着させた後、使用時に脱イオ ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む0、05mm 15-HCT縦微液(pH7. 5)を10 #1,Ave11で分注し、复 温で30分以上辞遣した後、液を楽て4℃で乾燥させ る。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250μ1/ we11で3回洗浄する。
- 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Gamma Globu line Coat Canna Clobulin含有1%ウシアルブミン溶液 を100 m1/we11分注し、これに試料あるいは標準液を 50 µ!添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5. 0. 0.05%Tiveen20溶液250μ1/we11で5回流 冷する。
- 8. ビオチン微識Fab′化IqC-apo8/427モノクローナ ル航体を1%BSA溶液で1. Bug/mlとしたものを1 00μ1/we11分離する。

- 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 8.3、と同様に0.005%Tvæen20溶液250μ1/w el1で5回洗浄する。
- 【0036】9、HRP標識アビジンD (Vector labor atories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈 とし、100μ1Ave11分注する。
- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tween20溶液250 μ1/weilで5回 洗浄する。
- 12、過酸化水素溶液とTMB2溶液からなる量色試薬 を100 u l/vell分注し、窒温下30分間反応させる。
 - 13.1Mリン酸水溶液を100 ml/well分注し、反応 を停止させる。
 - 14. 主波長450mg, 副波長630mmで測光する。
 - 15. 人工的に調整した変性LDL(酸化しDL)/ア ンチトロンピン3複合体により求めた検査線から試料中 の変性LDL (酸化LDL) /アンチトロンビン 3 復合 体線度を算出する。
- 【0037】(B-3) 【超遠心または硫酸デキストラ 20 ン/Ca九激法により調整したLDL中のLDLもしく は変性LDL (酸化変性LDL) /プラスミノーゲンア クチベータインヒビター1 複合体の創定]
 - 【0038】1、抗ヒトプラスミノーゲンアクチベータ インヒビター1ポリクローナル抗体(DAKO社)を 0. 05M Tris-HCl (0. 15M NaClを含む、pH8.
 - ()) 級値液に 1 () μ g/mlの割合で加え、マイクロプレー
 - トに 1 () () #1/we11で分注する。 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオ

ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ

- ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む()、05M Tr. 15-HCT報節液(pH7. 5)を10 # 1,AgeTTで分注し、宣 温で30分以上静畳した後、液を楽て4℃で乾燥させ、 る。乾燥したマイクロブレートを脱イオン水250m1/ xellで3回洗浄する。
- 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Gamma Globul inとGoat Gama Globulin含有1%ウシアルブミン溶液 を100 x 1/me11分往し、これに試料あるいは標準液を 50 µ!添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5.0.005%Tireen20溶液250μ1/ire11で5回流 浄する。6、ビオチン標識Fab' (ŁIOG-apo8/427モノ クローナル抗体を1%BSA溶液で1. βμq/mとした 6のを100 μ 1/km 11分注する。
 - 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
 - 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250μ1/w el1で5回洗浄する。
 - 【0039】9、HRP標識アビジンD (Vector labor atories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈 とし、100 µ1/we11分注する。
- 50 10.37℃下で30分間反応させる。

14

11.0.005%Tireen20溶液250μ1/mel1で5回 洗浄する。

13

- 12. 過酸化水素溶液とTMB2溶液からなる量色試薬 を100 x 1/xe11分注し、室温下30分間反応させる。
- 13.1Mリン酸水溶液を100ml/well分注し、反応 を停止させる.
- 14、主波長450mm、副波長630mmで測光する。
- 16. 人工的に調整した変性しDL(酸化LDL)/ブ ラスミノーゲンアクチベータインヒビター 1 復合体によ り求めた検量線から試料中の変性しDL(酸化しDL) 10 /プラスミノーゲンアクチベータインヒピター 1 複合体 濃度を算出する。
- 【0040】C. マクロファージが産生する殺菌物質と 複合体を形成したLDLもしくは酸化変性LDLの検出
- (C-1) 【超速心または硫酸デキストラン/Ca社談 法により調整したしDL中のLDLもしくは変性しDL (酸化変性LDL) /ミエロペルオキンダーゼ複合体の 測定]
- 【0041】1、抗ヒトミエロベルオキシダーゼポリク 26 ローナル抗体 (DAKO社) を()、() 5M Tms-KC)
- (0. 15M NaClを含む、pH8. () 緩筒液に1()μg/ 耐の割合で加え、マイクロブレートに 100 д Lavellで 分注する。
- 2. 4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオ ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む0、05M Tr ns MCT経貨液(pH7.5)を10 # 1/wellで分注し、窒 温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させ
- る。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250ヵ1/ 30 wellで3回洗浄する。
- 3.マイクロブレートに55mq/ml Mouse Gamma Globu Trnと Coat Casma Clobulin含有1%ウンアルブミン忽液 を100μ1/me11分注し、これに試酵あるいは標準液を 50μ!添加する。
- 4. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 5. 0. 005%Tween20溶液250μ1/ve11で5回流 待する。
- 6. ビオチン標識Fab (LIQC-apoB/427モノクローナ ル抗体を1%BSA溶液で1. 8 uq/mlとしたものを1 40 (0) μ1/well分注する。
- 7. 37℃で1. 5時間反応させる。
- 8.3、と同様に0.005%Tween20溶液250μ1/M el1で5回説浄する。
- 【0042】9、日RP標識アビジンD(Vector Tabor) atories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈 とし、100 ml/Mell分達する。
- 10.37℃下で30分間反応させる。
- 11.0.005%Tvieen20溶液250μ1/vie11で5回 洗浄する。

- 12. 過酸化水素溶液とTMB 2溶液からなる室色試薬 を100 n 1/we11分注し、室温下30分間反応させる。 13.1Mリン酸水溶液を100 u1/xe11分注し、反応 を停止させる。
- 14. 主波長450nm、副教長630nmで測光する。
- 15. 入工的に調整した変性しDL(酸化LDL)/ミ エロベルオキンダーゼ複合体により求めた検査線から試 料中の変性LDL(酸化LDL)/ミエロベルオキシダ 一を複合体濃度を算出する。
- 【①①43】(C-2)【超遠心または硫酸デキストラ ン/Ca沈澄法により調整したLDL中のLDLもしく は変性しDL(酸化変性LDL)/ラクトフェリン復合
 - 【0044】1、抗ヒトラクトフェリンポリクローナル 抗体(DAKO社)を0.05M Tris+に1(0.15M NaC1を含む、pH8. (1) 緩鎖液に10 μ g/m1の割合で加 え、マイクロプレートに100 #1/Mellで分注する。
 - 2. 4°C下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオ ン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブ ミン、0、05%アジ化ナトリウムを含む0、05M Tr 15-HC7殺貨液 (pH7. 5)を10 # 1 /wellで分注し、窒 湿で30分以上篩蹬した後、液を棄て4℃で乾燥させ。
 - る。乾燥したマイクロブレートを脱イオン水25041/ wellで3回洗浄する。
 - 3. マイクロブレートに5.5 mg/ml Mouse Gamma Globu linとCoat Camma Clobulin含有1%ウシアルブミン溶液 を10011/1/2017分注し、これに試料あるいは標準液を 50 m 1 添加する。
 - 4.37℃で1.5時間反応させる。
- 5. 0. 005%Tween20溶液250μ1/ve11で5回流
 - 6. ビオチン標識Fab' 化IqC-apo8/427モノクローナ ル族体を1%BSA溶液で1.6 ug/mlとしたものを1 00 μ l/well分注する。
 - 7.37℃で1.5時間反応させる。
 - 8.3、と同様に0.005%Tween20落液250μ1/w ellで5回洗浄する。
 - 【りり45】9、HRP標識アビジンD(Vector Tabor atories社製) を 1 % カゼイン溶滅で 1 5 0 0 0 倍希釈
- とし、100 m 1/me11分弦する。
 - 10.37℃下で30分間反応させる。
 - 1.1.0.005%Tiveen20溶液250μ1/veilで5回 洗浄する。
 - 12. 過酸化水素溶液とTMB 2溶液からなる量色試薬 を100m1/me11分注し、室温下30分間反応させる。
 - 13. 1Mリン酸水溶液を100 u1/me11分注し、反応 を停止させる。
 - 14. 主液長450 mm、副液長630 mmで測光する。
- 15. 人工的に調整した変性し口し(酸化し口し)/ラ
- 50 クトフェリン複合体により求めた検量線から試料中の変

点点 新文学 美国大学的中央人们 是自己的 "我对话,我们这个不是自己,我还有自己,他们只是是一个大学的大学的人的,我们就不是一个大学的人的,不是这样的人的现在分词

性しDL(酸化しDL)/ラクトフェリン複合体濃度を 算出する。

【()()46】D. 各種脂質濃度別血清中のLDしもしく は変性LDL(酸化LDL)と急性相反応蛋白または、 起国・根溶系型白または、殺菌量白との複合体濃度の比 較血清中脂質条件 1 群 (コレステロール 1 6 0 mg/d) >、中性脂肪 1 0 0 ma/d1>、HDL コレステロール4 0~90mg/d1)、脂肪条件2群(コレステロール16 1~2!9mq/d1>、中性脂肪101~139mq/d1>, HDLコレステロール40~90mg/d1)、脂肪条件3 群 (コレステロール220 mg/d1<, 中性脂肪140 mg/ diく、HDLコレステロール4 (ag/di>)。の3群に ついて、LDLもしくは変性LDL(酸化LDL)と無 怪組反応器白複合体の測定例として (アミロイドA圏白 と々2-マクログロブリン)、LDLもしくは変性LD し(酸化変性)と経間・線溶系蛋白複合体の測定例とし て(プロトロンビン、アンチトロンビン3)、マクロフ アージが産生する殺菌物質としDLもしくは変性しDL (酸化LDL) との複合体の測定例として (ミエロベル オキンダーゼ、ラクトフェリン)の血清中濃度を比較し、26 た。 たところ、いずれの複合体濃度も第3群(高脂質血症 祭) において最も高値を示した(図1)。

【0047】<u>E. 先の出版 (特願平11-207913</u> 号)

(三-1) 先の発明に至る経緯

【0048】光の出類に先立って、本発明者は、しDLとフィブリノーゲンおよびしDLとフィブロネクテンの複合体形成を試み、人工的に酸化変性を受けたしDLにより複合体が形成されることを確認した。即ち、native LDL、糖化しDLおよび、酸化LDLに精製品フィブリノーゲン又はフィブロネクチンを振加し、いずれのLDLがフィブリノーゲン又はフィブロネクチンと複合体を形成するかを検討した。各LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料をアガロース電気泳動後、ファットレッド(Fat red)7 Bによる脂質染色およびイムノブロット(incounchloty法によるフィブリノーゲン又はフィブロネクチン染色を行った。

【0049】その結果、nativeLDLおよび糖化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクテンの混合試料では複合体形成を認めなかったが、血管内皮細胞処理が確 40酸鋼処理により調整した酸化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料では複合体(酸化LDLーフィブリノーゲン複合体、酸化LDLーフィブロネクチン複合体)の形成を認めた。さらに、糖尿病や心筋梗窒患者血済を用いて、超速心分離により得たしDL(1.008a/mlくd<1.083a/ml)を抗ヒトフィブロネクチンイムノアフイニティクロマト手法によって、しDLーフィブリノーゲン複合体、LDLーフィブロネクチン複合体を単酸結製した。このLDLーフィブリノーゲン複合体、LDLーフィブリノーゲン複合体、LDLーフィブロネクチン複合体を上

彩成するLDLの性質として、酸化しDLに特徴的な脂質過酸化物の増加、ApoB蛋白の筋塊、そしてしDL粒子全体の酸性荷電の増加を認めた。さらに、ゲル流過分析にて得た各国分を用いたELISAから、しDL面分中にLDL-フィブリノーゲン複合体、LDL-フィブロネクチン複合体の存在が確認された。

【0050】そこで本発明者らは、しDLないしは酸化 LDLがフィブロネクチンという好都合な標識を付けて 存在する事実に着目し、酸化LDLと複合体を形成する フィブロネクチンを特異的に認識するモノクローナル抗 体を作製できれば、この病体を用いて血液中のしDLないしば酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を認識、 測定、単離精製することが可能と考えた。

【0051】統体作製時の病原には、人工的に調整した酸化しDL-フィブロネクチン複合体を用いた。得られた病体のフィブロネクチンに対する反応特異性は、nativeフィブロネクチンには反応性を示さないが、酸化LDLと複合体を形成するフィブロネクチンを認識した。また、本抗体は、ApoB蛋白は認識しないことも判明した。

【0052】 (E-2) 航ヒト酸化LDL結合フィブロ ネクチンモノクローナル統体の作製法

(モノクローナル抗体作製法の一例)

【抗原の調整】ヒト血清から超遠心分離により得たLDL(1.006g/ml/くd<1.063g/ml/を抗ヒトα1アンチトリプシンポリクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラムを通し、LDLーα1アンチトリプシン複合体を除去する。とのα1アンチトリプシンフリーのLDLに結誤ヒトフィブロネクチンを添30 加し、硫酸銅液を加え、37℃に1夜放置して、酸化LDLーフィブロネクチン複合体を形成させた。

【0053】LDLとフィブロネクチンの複合体形成の確認は、複合体を試料としてゲル流過分析により得た各國分だついてELISA(固相抗体として抗ヒトフィブロネクチン抗体、酵素機識抗体に抗ヒトApoB抗体を用いる。)を実験することにより確認できる。

【0054】【動物への免疫】この複合体(抗原)をリン酸級価生理負塩水で蛋白濃度として1mg/ml溶液となるように調整し、この溶液をフロインドアシュバンドを等量混合して得られるエマルジョンを、6週合のマウス(Balb/C系マウス)の腹腔内に500μ1役与した。この作業を2週間おきに計3回免疫を行った。

分注し、2~3日後、抗体産生ハイブリドーマの選択を 行った。

【0056】選択方法は、酸化LDL-1gA複合体、 nativel g A. nativea p o Bを各々固定化した96次 マイクロブレートに、各ウェルのハイプリドーマ形成コ ロニーの培養上清を10001分注して反応させ、つい で洗浄後、ペルオキシダーを標識抗でウスイムノグロブ リン統体を100μト添加して、抗原統体反応させ、洗 巻、屋色とBLISAの常法に従って操作し、目的とす る抗体(酸化しDL結合フィブロネクタンに反応性を示 10 すが、nativeフィブロネクチン、native& p o Bには反 応しない抗体) 産生バイブリドーマを複数個選択した。 次に、目的とする抗体産生を示したコロニーを回収し、 限界機釈法によってハイブリドーマの単一コロニーを得 るようにクローニングを行った。この方法は、回収した コロニーをHT培地で希釈し、96六マイクロプレート の各ウェルにハイブリドーマがウェル当たり1個以下と なるようにフィーダー細胞と共に散布した。以上の操作 を2回行い、モノクローン化された抗ヒト酸化LDL結 台フィブロネクチン抗体産生ハイブリドーマを複数個得 20

【OO57】〔抗ヒト酸化しDL給合フィブロネクチン モノクローナル抗体の腹水化】8週令のマウス(Bal b/C系マウス)の腹腔内にブリスタン(免疫抑制剤) を投与した。3~7日後に抗体産生ハイブリドーマを腹 腔内に投与し、約7日後にマウス腹腔から腹水化された 抗体を固収した。

【0058】 〔烷体の精鎖〕 腹水化して得られたそれぞ れの抗体を50%硫酸アンモニウムで2回塩折分離を行 の抗ヒト酸化しDL結合フィブロネクチンモノクローナ ル抗体と人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチ ン複合体をそれぞれ反応させ、二次抗体として抗ヒトム p o B酵素標識抗体を用いたELISAにおいて感度に 優れた、抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノク ローナル抗体(OFN-1と命名)を選定した。

【0059】(E-3)本発明によれば、彼検体の血液 成分を本発明の抗体と接触させ、該抗体と特異的に反応 した抗原量を定量することにより、血液中に含まれるし DLないしは酸化LDL - フィブロネクチン複合体を測 40 定することができる。測定法はラジオイムノアッセイ、 酵素免疫法、イムノブロット法、免疫流降法、蛍光イム ノアッセイ、化学者しくは生物発光イムノアッセイなど の公知法によって行われる。

【0060】酵素免疫法 (ELISA) によるLDLな いしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体の測定法を 例にとり、以下に具体的に説明する。

〔マイクロプレートへの抗体の固定化〕マイクロブレー ト(NUNC社製)の各ウェルに、猿ヒト酸化しDL結 合フィブロネクチンモノクローナル抗体(OFN-1) 50 倍数 (pH8.4) を100μ1ずつ分注し、3.7℃で放

5 μ q/ml) を含む(). 1 Mトリス段函版 (pH8. 4) を 100μ!ずつ分注し、一夜4℃で放置して抗体を固相 に吸着させる。

18

【0081】 (酵素標磁統体の調整) 別途、抗ヒトAp oBポリクローナル抗体、あるいは統ヒトApoBモノ クローナル抗体(酸化しDLを抗原として作製したも の) をペプシンと2ーメルカプトエタノールアミンによ りFab' に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0082】〔血溶中あるいは血漿中しDLないしは酸 化しDL-フィブロネクチン複合体の測定〕各ウェルに 100µ1の1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液 (0.1M、pH8.0)を分注、次いで血清もしくは血 漿50μ!を加えて泥和した後、37℃で2時間反応さ せる。次に洗浄液(Tween20を終端度()、()()5%含む リン酸緩衝液:0.02M;pH7.4)で3回洗浄す ð.

【0063】その後、ペルオキシダーを標識抗ヒトAp oBFab、航体溶液(1%ウシアルブミンを含むトリ ス級顕液)を基ウェルに100ヵ1ずつ加え混合した 後、37℃で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄す る。基質発色液は、1.66mMTMB2(同仁化学) をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になる ように0.2Mトリス緩觸液を加えた基質溶液と、0. 02%過酸化水素を含む35mMクエン酸溶液とを等置 ずつ混和した溶液100μ1を各ウェルに加え、窒息で 10分間放置後、反応停止液(2.5Mリン酸溶液)1 (1) µ 1 を各ウェルに加える。

【0084】マイクロブレート用比色計を用いて450 /630mの波長で比色し吸光度を算出する。 人工的に い、リン酸緩衡生理食塩液にて透析して精製し、複数個 30 調整した酸化しDL-フィブロネクチン複合体を上述と 同様の操作にて反応させ、作製した検量線から試料中の一 LDしないしは酸化LDレーフィブロネクチン複合体濃 度を算出する。

> 【0065】(<u>E-4</u>)また、本発明によれば、LDL もしくは酸化しDLとフィブロネクチン復合体を含む動 脈硬化性疾患に関わる新規なリボ蛋白は、細胞外基質成 分に対して沈若性が強力であることから、固相に細胞外 基質蛋白を固定化し、この蛋白に結合させたLDLない しは酸化しDLとフィブリノーゲンもしくはフィブリン (又はそれぞれの分解度物) との復合体、およびLDL ないしは酸化しDLとフィブロネクチンの複合体を含む 助賦硬化性病変に関わる新規なリポ蛋白を検出する方法 について述べる。個相化に細胞外基質蛋白として、血管 をはじめ皮膚、骨、腱、筋などの生体のほとんどすべて の組織に存在するコラーゲンを用いた測定法を例にと り、以下に具体的に説明する。

> 【0066】 【マイクロプレートへの細胞外基礎蛋白の 固定化) マイクロブレート (NUNC社製) の各ウェル に I 型コラーゲンを I O μ q/mlを含む O. IMトリス緩

DE PROPERTIES DE LE COMPLETE DE LE COMPLETE DE LE COMPLETE DE LE COMPLETE DE LA COMPLETE DE

避して蒸発を図させてコラーゲンを図相に吸着させる。 【0067】(酵素標識技体の調整)別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体。あるいは抗ヒトApoBモノークローナル抗体(酸化LDLを抗原として作戦したもの)をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab′として、ペルオキシダーゼをこのFab′に標識して酵素機能抗体を調整する。

19

【0068】〔血糖中あるいは血漿中のコラーゲン結合 性リボ愛白の測定〕各ウェルに100μ1の1%ウシア ルブミンを含むトリス機順液(0.1M、pH8.0)を 10 分注、次いで血清もしくは血漿50μ1を加えて混和した後、37℃で2時間反応させる。次に洗浄液(Twen2 6を終濃度0.005%含むリン酸機筒液:0.02 M:pH7.4)で3回洗浄する。その後、ベルオキシダーを擦洗けヒトApoBFab が、抗体溶液(1%ウシア ルブミンを含むトリス機削液)を各ウェルに100μ1 ずつ加え複和した後、37℃で1時間反応させ、先と同 標に3回洗浄する。

【0069】基翼発色液は1.86mMTMB2(同仁化学)をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50% 29になるように0.2Mトリス緩衝液を加えた基置溶液と、0.02%過酸化水素を含む35mMクエン酸溶液とを等置ずつ混和した溶液100μ1を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液(2.5Mリン酸溶液)100μ1を各ウェルに加える。マイクロプレート用比色計を用いて450/630mmの液長で比色し吸光度を測定する。ヒト血清かちコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単離・精製したコラーゲン結合性リボ蛋白について上速と同様の操作にて反応させ、作成した検査線から試料中のコラーゲン結合性リボ蛋白、30線度を算出する。

【0070】(<u>6-5</u>) さらに、本発明によればしDLか酸化LDLとフィブリノーゲンやフィブリン(又はそれぞれの分解塵物) もしくは、フィブロネクチンとの彼合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なリボ蛋白はポリスチレンやナイロンなどの高分子化合物に対して結合性が強力であることから、固相法によっても該リボ蛋白を創定することができる。固相にポリスチレン製マイクロブレートを用いた方法を例にとり、具体的に説明する。

【0071】〔酵素標識病体の調整〕別途、抗ヒトApoBボリクローナル抗体 あるいは病ヒトApoBモノクローナル抗体 (酸化LDLを抗原として作製したもの)をペプシンと2ーメルカプトエタノールアミンによりFab'として、ペルオキシダーゼをこのFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0072】 (血清中あるいは血漿中の動脈硬化性病変 に関わる新規なリボ蛋白の固相法による測定)無処理の ボリスチレン製マイクロブレート (NUNC社製)の各 ウェルに100μ1の1%ウシアルブミンを含むトリス 50

報酬数(0.1M、pH8.0)を分注、次いで血清もしくは血漿50μ1を加えて混和した後、37℃で2時間反応させる。次に洗浄液(Tween20を終濃度0.005%含むリン酸緩順液:0.02M:pH7.4)で3回洗 待する。

26

【0073】その後、ベルオキシダーを繰路抗ヒトApoBFab′ 抗体溶液(1%ウシアルブミンを含むトリス級関液)を各ウェルに100μ1ずつ加え混和した後、37℃で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄す

る。養質発色滅は1.86mMTMB2(同仁化学)をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になるように0.2Mトリス緩管液とを等置ずつ復和した溶液100μ!を各ウェルに加え、空温で10分間放置後、反応停止液(2.5Mリン酸溶液)100μ!を各ウェルに加える。マイクロプレート用比色計を用いて450/630mの波長で比色し吸光度を算出する。ヒト血溶からコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単額・結設したLDLか酸化LDLとフィブリノーゲンやフィブリン(又はそれぞれの分解産物)との複合体。LDLもしくは酸化しDLーブィブロネクチン複合体を含む助解硬化性病変に関わる新規なリボ蛋白を上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中の酸リボ蛋白速度を算出する。

【0074】また、本発明によればしDLもしくは酸化 LDLとフィブリンーゲンもしくはフィブリン(又はそれぞれの分解産物)との複合体を含む助脈硬化性病変に 関わる新規なリボ蛋白の検出方法についても以下に具体 的に説明する。

【0075】【マイクロブレートへの抗体の固定化】マイクロフレート(NUNC社製)の各ウェルに、抗ヒトフィブリノーゲン抗体(DAKO)5 μq/mlを含む0. 1Mトリス凝黄液(pH8. 4)を100μ1ずつ分注し、一夜4℃で放置して抗体を固相に吸着させる。【0076】【酵素標識抗体の調整】別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体。あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体をペプシンと2ーメルカプトエタノールアミンによりFab′に領議して酵素標識抗体を調整する。

【0077】〔血濟中のLDLないしは酸化LDL/フィブリノーゲンもしくはフィブリン(又はそれぞれの分解産物)復合体(LDL-フィブリノーゲン間連物質復合体と略記することがある)の測定〕 各ウェルに100 μ1の1%ウシアルブミンを含むトリス経濟液(0.1 M. pH8.0)を分注、次いで血清50μ1を加えて浸和した後、37℃で1時間反応させる。次に洗浄液(Tween20を終遺度0.005%含むリン酸経額液:0.0 2M:pH7.4)で3回炎浄する。その後、ペルオキシダーセ構造抗ヒトApoBFab′ 抗体溶液(1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液)を各ウエルに100μ1ずつ加え混合した後、37℃で1時間反応させ、先と

同級に3回洗浄する。

【9978】基質発色液は、1.66mMTMBZ(同 仁化学)をメタノールで溶解後、メタノール譲渡が50 %になるように()、2Mトリス経筒波を加えた基質溶液 と、0、0.2%過酸化水素を含む3.5 mMクエン酸溶液 とを等置ずつ隠和した恋波100μ1を各ウェルに加 え、室温で10分間放置後、反応停止液(2.5 Mリン 酸) 100 μ1を各ウェルに加える。

【0079】マイクロプレート用比色計を用いて450 調整した酸化LDL-フィブリノーゲン複合体を上述と 同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中の LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度を算出す

【0080】(E-6) LDL画分中に存在するしDL <u>ーフィブリノーゲン関連物質複合体、LDL-フィブロ</u> ネクチン複合体およびコラーゲン結合性LDLの確認 ヒト血清を超遠心分離し、得られたしDL(1、006 < d < 1. () 6.3 q/a]) 画分を用いてゲル濾過分析を行 い、各フラクションについて以下の如き組み合わせでE 29 LISAを実施した。即ち、LDL(抗ヒトApoB/ 抗ヒトApoB)、LDL/フィブロネクチン複合体 〈抗ヒトフィブロネクチン/抗ヒトApoB〉. LDL /フィブリノーゲン復合体(抗ヒトフィブリノーゲン/ 抗ヒトApoB)、コラーゲン接着性LDL(コラーゲ ン/ 抗ヒトApoB) を測定した結果。図2に示すごと くしDL面分中にLDL/フィブロネクチン復合体、L DL/フィブリノーゲン複合体、コラーゲン接着性LD しの存在を認めた。

【9081】(<u>E-7</u>)<u>血中Lp(a)濃度とコラーゲ</u> 30 ン結合性Lp(a)濃度の関係および、血中LDL/フ <u>ィブリノーゲン関連物質との復合体濃度とコラーゲン結</u> 台性LDL濃度の関係

細胞外基質成分への結合性を示すが由に動脈硬化症の危 険因子とされているLp(a)は、血中のLp(a)濃 度依存性にコラーゲン結合性Lp(a)として検出され る。即ち、血中に存在するLp(a)はすべて細胞外基 質成分への結合特性を有することが示唆される(図3 a)。Qushingらはアポ蛋白(a)が細胞外毒質蛋白と 結合しやすい可能性を示唆している(Arteriosclenos) s. 9:593、1989)。LDしではその一部が細胞外基質 成分への結合性を示すにすぎず(図3b)、血中のLD

上総量から細胞外基質成分結合性のリボ蛋白量を指定す るととはできない。しかし、血中のLDL/フィブリノ ーゲン複合体波度とコラーゲン結合性LDL濃度の相関 性は(図3c)のごとく良好であることから、LDL/ フィブリノーゲン復合体とコラーゲン結合性LDLは同 一物質である可能性が示唆される。従って、LDLが細 **胞外基質蛋白と結合性を示すのはLDLに結合している** フィブリノーゲン関連蛋白に依存している可能性が示唆 される。つまり、血中しDL中にLp(a)と同様の細 /630mmの波長で比色し吸光度を算出する。人工的に 10 胞外基質成分結合性のリポ蛋白(動脈硬化症惹起性リポ 蛋白) が存在する。

> 【0082】(E-8) 館席者血清中のLDL-フィブ リノーゲン間迫物質複合体線度の分布

> 健常者血清中のしDL-フィブリノーゲン関連物質の濃 度は図4の如くである。

> 【0083】<u>(E-9) 健常者、増尿病患者およびマル</u> チブルリスクファクター空候緊急者血清中のLDL-フ ィブリノーゲン関連物質複合体質

図5に示すことく糖尿病患者もよびマルチブルリスクフ ァクター症候群患者血清中のLDL-フィブリノーゲン -関連物質複合体量は健食者に比べて有意に高値であっ

【図面の簡単な説明】

【図1】血中脂質濃度が異なる3 製筒におけるしりしも しくは変性しDiと急性相反応蛋白(A)、凝固・線溶 系羅白 (B). 殺菌蛋白 (C) との復合体造度の 比較を図示したものである。

【図2】LDL回分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関 連物質複合体。LDL-フィブロネクチン複合体およびコ ラーゲン結合性リボ蛋白を示したものである。

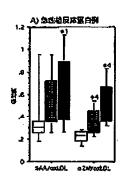
【図3】血中Lp(a)濃度と細胞外基質蛋白(コラーゲ ン)結合性Lo(a)濃度の関係、血中LDL-コレステロ 一ル境度と動脈硬化性病変に関わる新規なリボ蛋白機 度、および、LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体波 度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係を示したものであ

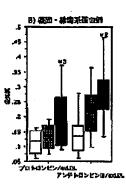
【図4】健寓者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物 質複合体濃度の分布を示したものである。

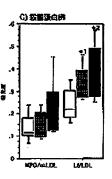
【図5】健常者、糖尿病患者およびマルチブルリスクフ ァクター症候群患者血滑中のLDL-フィブリノーゲン関 連物質複合体量の比較を示したものである。

AND EAST PARTY OF THE PROPERTY OF THE PARTY OF THE PARTY OF THE PARTY OF THE CONTRACT OF THE PARTY OF THE PAR

[図1]





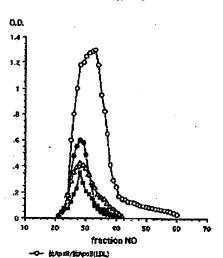


#1:p=0.01, +2:p<0.005, +5:p<0.001, #4:p<0.000

☐ 有更条件2 ■ 有更条件2 SAペアミロイドA研合 ostに aペマクログロブリン NPG ミエロベルオキンゲート Lたラクトフォリン

図1 血中脂質速度が異なる3群間におけるLDLもしくは全性LDLと急性相反応強白(A)、 森因・緑溶系蛋白(B)、最簡蛋白(C)との複合体連度の比較

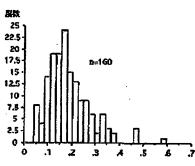
[図2]



- --- and an and and and
- **一◇**一 コラーダン/前4968
- ・ - ボフィブリノーグン/MADOB (LDL-フィブリノーグン実施的)

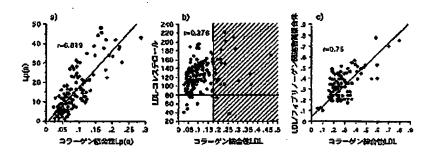
ヒト血清LDL画分中に存在するLDL・フィブリノーゲン関連成分 との複合体、LDL・フィブロネクチン複合体およびコラーゲン 結合性リポ蛋白

[図4]



健常者血波中のLDL・フィブリノーゲン製連 物質複合体態度の分布 TWING CONTRACTOR AND AND TWO SERVICES AND THE SERVICES OF A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR OF THE CONTRACTOR OF TH

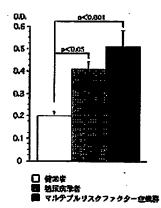
【図3】



Williams 5 (Arterioscler, Trom., 15: 551, 1995) による耐たな熱は硬化発症機序伝染 (血管内皮下の指質は著生発地とする 根序伝説) では、由中LDLコレステロー分連点が80mg/回址上に立れば血管の皮下に耐質は着か生することを気味しているが、本質別者らは血中にLD(a)と同様に熱の硬化性原本に関わる破界なり本蛋白 (LDL-フィブリノーゲン機能物質との操合体を含む線形外系質点の発合性リポ蛋白: コラーゲン機合性DLなど) が存亡することが、血管内皮上は分と由受比者発生にあまであることを見出した。 (配25中、禁薬部分に存在する走所が動態硬化性皮根に関わる刺激なりが発音機体的)

应中Lp(a)機関と構物外径質感白(コラーゲン)結合性Lp(a)準度の関係、血中LDL-コレステロール 準度と勤新硬化性疾患に関わる新規なり求蛋白濃度、およびLDL-フィブリノーゲン関連成分との結 合体速度とコラーゲン結合性LDL減度の関係

[図5]



健帯者、糖尿病患者、マルチプルリスクファクター造像群におけるLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量の比較

フロントページの続き

(51) Int.Cl.'		識別記号	Fi		ゲーママート" (委	3学)
C12N	15/02		G01N	33/53	Ĺ	
GOIN	33/53	·	•	33/577	В	
				33/68		
	33/577		C12P	21/08		
	33/68		C 1 2 N	15/00	A ,	
// C12P	21/08				C	

特閱2001-91517

下ターム(参考) 20045 AA13 AA25 CA26 DA64 DA80 FA11 FA29 FB03 FB11 GC10 48024 AA11 BA53 GA03 HA15 48064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4H045 AA10 BA10 BA40 CA42 DA65 DA76 DA86 EA50 FA72 HA07